



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09037719 A**(43) Date of publication of application: **10 . 02 . 97**

(51) Int. Cl.

A23J 3/14
A23J 3/34
A23L 1/305
A61K 35/78
A61K 38/00
A61K 38/55

(21) Application number: **07212995**(22) Date of filing: **31 . 07 . 95**(71) Applicant: **GEKKEIKAN SAKE CO LTD**

(72) Inventor:
SAITO YOSHIYUKI
OURA ARATA
KAWATO SHOJI
SUGINAMI KOJI
IMAYASU SATOSHI

(54) ORALLY INGESTIVE SUBSTANCE**(57) Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an inhibitor of prolyl endopeptidases useful as a medicine, a functional food, a food for health, a food and drink, etc., effective in preventing and treating senile dementia by treating a rice protein with a proteolytic enzyme.

SOLUTION: A rice protein such as a prolamin, a glutelin, a globulin, an albumin or a proteose or a substance

containing the rice protein is treated with a proteolytic enzyme to afford an inhibitor of prolyl endopeptidases. The resultant treated substance is converted into a pasted, a dried or a diluted substance. Furthermore, brown rice, milled rice or a brewed food such as SAKE (Japanese rice wine), sweet SAKE, miso or soy sauce prepared from rice as a raw material is cited as the substance containing the rice protein.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-37719

(43) 公開日 平成9年(1997)2月10日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 2 3 J 3/14			A 2 3 J 3/14	
			3/34	
A 2 3 L 1/305			A 2 3 L 1/305	
A 6 1 K 35/78			A 6 1 K 35/78	U
38/00	A A M		37/18	A A M
審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 5 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平7-212995

(22) 出願日 平成7年(1995)7月31日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成7年7月5日
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会誌第69
巻臨時増刊号」に発表

(71) 出願人 000165251

月桂冠株式会社

京都府京都市伏見区南浜町247番地

(72) 発明者 斉藤 義幸

宇治市木幡松尾28-30

(72) 発明者 大浦 新

京都市伏見区下鳥羽須釜町2-1

(72) 発明者 川戸 章嗣

宇治市木幡熊小路1-32

(72) 発明者 杉並 孝二

城陽市寺田宮の谷5-52

(72) 発明者 今安 聡

京都市伏見区桃山筑前町6

(74) 代理人 弁理士 戸田 親男

(54) 【発明の名称】 経口摂取物

(57) 【要約】

【解決手段】 米蛋白の蛋白質分解酵素分解物（又はその処理物）を含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害用経口摂取物。

【効果】 本有効成分は、阻害能が高いだけでなく、天然物由来であるため安全性が高く、医薬品として及び／又は飲食品として、特に痴呆症の予防、治療に有利に使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 米蛋白質又は米蛋白質含有物を蛋白質分解酵素で処理することを特徴とするプロリルエンドペプチダーゼ阻害物質の製造方法。

【請求項2】 請求項1の方法によって得た、米蛋白質の蛋白質分解酵素分解物もしくはその処理物を含有することを特徴とするプロリルエンドペプチダーゼ阻害用経口摂取物。

【請求項3】 該米蛋白質の蛋白質分解酵素分解物が、米蛋白質由来のペプチド又は酒粕分解物であることを特徴とする請求項2に記載の経口摂取物。

【請求項4】 該処理物が、米蛋白質の蛋白質分解酵素分解物の濃縮物、ペースト化物、乾燥物、及び／又は希釈物であることを特徴とする請求項2又は請求項3に記載の経口摂取物。

【請求項5】 該経口摂取物が、医薬品タイプ又は飲食品タイプのものであることを特徴とする請求項2～請求項4のいずれか1項に記載の経口摂取物。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、米蛋白質の蛋白質分解酵素分解物（又はその処理物）を含有するプロリルエンドペプチダーゼ阻害用経口摂取物に関する。本発明の経口摂取物は、プロリルエンドペプチダーゼを阻害することができるので、特に最近増加傾向にある老人性痴呆症の予防及び治療に有効な医薬品又は機能性食品や、特定保健用食品、栄養剤、健康食品等の飲食品に利用することができる。

【0002】

【従来の技術】高齢化社会を迎えた現代にとって老人医療の重要性が大きくクローズアップされている。その中でも痴呆症の予防や治療は、本人だけでなく家族や社会を含めた大きな問題となっている。痴呆症の代表的なものには脳血管性痴呆とアルツハイマー型痴呆があり、前者に比べ後者は原因が未だ完全には解明されていない。また、アルツハイマー型痴呆は健忘症とも言われ、短期間の記憶の消失以外には他の運動能力などにあまり障害が現れない為、介護に重い負担がかかり大きな問題となっている。それゆえ治療法の開発が急務となっている。バックグラウンドや発症機構は未だ不明な点も多いが、治療薬の開発は活発に行われつつあり、臨床試験にまで進んでいるものもある。

【0003】プロリルエンドペプチダーゼ（以下、PEPということもある）（EC3.4.21.26）は、プロリンに特異性を持ち、そのカルボキシル基側でペプチドを切断するセリンプロテアーゼで、脳、睾丸、肝臓での活性が高いことが知られている（蛋白質核酸酵素、25、513-523、（1980）、蛋白質核酸酵素、29、127-133、（1984））。PEPは神経伝達物質サブスタンスPや記憶に関係していると考

えられるTHR（甲状腺刺激ホルモン）およびバソプレッシンを分解することが知られている。バソプレッシンは腎臓での水分再吸収に働くペプチドホルモンであるが、脳内で学習、記憶の過程にも関与しており、このホルモンの分解不活性化がおくと健忘症が進行するという事実がある。また、痴呆症患者のバソプレッシン量は、正常人のそれより少ないことがわかっている（BIOINDUSTRY、4、788-796、（1987））。

【0004】バソプレッシンは、PEPによって2つのペプチドに分解される。健康人では脳でのPEPが正常に働いているが、何らかの理由で調節機構がはずれるとバソプレッシンが必要以上に分解され、記憶保持に障害が現れる。したがってこの酵素の活性を阻害し痴呆症の治療をめざす研究がなされている。例えば、プロリルプロリナル誘導体（蛋白質核酸酵素、29、127、（1984））、N-アシルピロリジン誘導体（特開昭61-37764、特開昭61-183297、特開昭61-238775、特開昭61-238799、特開昭62-114957）などがスクリーニングされている。しかし、これらは合成品のため安全性に問題があるし、また構造が類似であるため既に構造活性相関が明らかとなっている（ABC、55、37-43、（1991））。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】老人性痴呆症の予防及び治療のために、安全で新しい構造を持ったプロリルエンドペプチダーゼ阻害物質が求められており、本発明は、このような特に安全性の高いすぐれた新規PEP阻害物質を開発する目的でなされたものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、本発明者らは、天然物質中に副作用の無いプロリルエンドペプチダーゼ阻害物質を鋭意検索した結果、米蛋白質の分解物中に本阻害物質の存在を認め、該物質がペプチドであることを見だし本発明を完成した。また副産物を原料とすることから資源の有効利用ともなるものである。

【0007】本発明のPEP阻害物質としては、米蛋白質又は米蛋白質含有物質を蛋白質分解酵素で処理して得られたものを使用する。米蛋白質としては、プロラミン、グルテリン、グロブリン、アルブミン、及び／又はプロテオース等が精製品はもとより粗製品も使用できる。また、米蛋白質含有物としては、こ（れら）の米蛋白質を含有する物質が広く使用され、例えば、玄米、白米、糠、米を原料とする醸造食品（清酒、味りん、味噌、醤油など）のほか、その副産物（糠、粕など）が使用される。

【0008】米蛋白質（含有物質）は、次いで、蛋白質分解酵素で処理する。この分解処理は、所望するのであ

れば、酵素分解のほか、化学的分解、物理的分解といった既知の蛋白質分解法が適宜、単用又は併用される。酵素分解法は、マイルドな条件で行われるので生成ペプチドの変性が低い等の利点があり、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、フィシンといった動植物起源の蛋白質分解酵素のほか、微生物起源の蛋白質分解酵素を用いて処理すればよい。

【0009】すなわち、米蛋白からのプロリルエンドペプチダーゼ阻害物質の分離精製は酸、アルカリ、または酵素により分解したものを、必要ならば抽出、濃縮したのち種々の吸着剤に対する吸着親和性の差、種々の溶剤に対する溶解性の差、分子篩効果による溶出速度の差などの通常分離精製に用いられる方法や、それらを適宜組み合わせるおこなえばよい。この分離精製は米蛋白を原料とした方が効率はよいが、玄米、白米、糠をそのままを使用してももちろん可能である。ここでいう米蛋白は、溶媒分画法により蛋白質を抽出することや逆に蛋白質以外の澱粉などを酵素により分解することでも得られる。また、米を原料とする醸造食品（清酒、味りん、味噌、醤油など）の製造において発生する糠や粕などの副産物をそのまま、または上記の溶媒分画法を適用したものを蛋白源として利用できる。醸造食品の副産物の場合は、醸造中に蛋白質の分解が起きていることが考えられるので、新たな分解は必要無い場合もある。具体的には、加水分解の条件としては特に限定はされないが、プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を指標として決めればよい。

【0010】本発明のPEP阻害物質は、米蛋白質（含有物質）を蛋白質分解酵素で分解して得たもの（又はその処理物）であって、その中にはペプチドが含まれている。例えば、酒粕のペプシン分解物を逆相クロマト処理を含む精製処理に付したところ、8～10残基のペプチド（LLSPFWNINA、LSPFWNINA、SPFWNINA）が単離され、特に10残基のペプチドに高いPEP阻害活性が認められた。

【0011】また、これらのペプチド又はそれらの混合物にまで単離精製しなくても、酒類をペプシンで分解可溶化したものも、高いPEP阻害活性を有していた。

【0012】したがって、本発明のPEP阻害物質としては、米蛋白（含有物質）を蛋白質分解酵素で分解したもの（又はその処理物）が適宜使用でき、例えば酒粕分解物が使用できるほか、ペプチドも使用することができる。

【0013】米蛋白の蛋白質分解酵素分解物は、これをそのまま使用するほか、その処理物（濃縮物、ペースト化物、乾燥物、又は希釈物等）もPEP阻害物質として使用することができる。

【0014】本発明においては、こ（れら）のPEP阻害物質を有効成分として、PEP阻害用経口摂取物とするものである。本発明に係るPEP阻害用経口摂取物

は、医薬品タイプとしてまた飲食品タイプとして使用することができる。

【0015】本発明のPEP阻害物質は、後記する実施例からも明らかなように、卓越したPEP阻害活性を有し、しかも天然物由来であって安全であり、現にウィスター系マウス10匹を用いた10日間の急性毒性試験においても、酒粕分解物の場合、1000mg/kgの経口投与でも死亡例は認められず、高い安全性が確認された。

【0016】飲食品タイプとして使用する場合には、本有効成分であるPEP阻害物質（その処理物）をそのまま、使用したり、他の食品ないし食品成分と併用したりして適宜常法にしたがって使用できる。本有効成分を用いる本発明に係る経口摂取物は、固体状（粉末、顆粒状その他）、ペースト状、液状ないし懸濁状のいずれでもよいが、甘味料、酸味料、ビタミン剤その他ドリンク剤製造に常用される各種成分を用いて、健康ドリンクに製剤化すると好適である。この場合、使用量に格別の限定はなく、機能性食品、特定健康食品、栄養剤、健康食品として、適宜飲食に供することができ、しかも安全性が高いので長期間に亘って摂取することも可能である。

【0017】医薬品タイプの組成物として使用する場合、本有効成分は、種々の形態で投与される。その投与形態としては例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して1回約0.1mg乃至1,000mgを投与することができる。

【0018】本発明に係る有効成分は、天然起源であるため、上記したように毒性は全くないか又は極めて低く、卓越した安全性を示し、急性毒性は全く認められなかった。したがって飲食品タイプの組成物として使用する場合は、予防用、保健用、通常の飲食品として使用するもののいずれにおいても、有効成分の使用量に格別の限定はないし、医薬として使用する場合も、患者に応じて上記範囲内で適宜使用すればよい。また、本有効成分は多量に服用しても格別の副作用は認められず、きわめて安全である。

【0019】

【実施例1】プロリルエンドペプチダーゼ阻害活性の測定と阻害物質の調製を次のようにして行った。

【0020】1) PEP阻害活性測定法

下記表1の手法にしたがい、PEPの阻害活性を測定した。

【0021】

【表1】

0.1U/ml PEP in same buffer	0.1ml
0.1M Phosphate buffer pH 7.0	0.2ml
sample	0.1ml
	30℃, 5min
2mM Z-Gly-Pro-pNA in 40% dioxane	0.1ml
	30℃, 10min
1N HCl	0.5ml
	OD 410nm

0.1U/ml PEP in same buffer : Proline specific Endpeptidase
(Flavobacterium sp.)

2mM Z-Gly-Pro-pNA in 40% dioxane : N-Cbz-Glycyl-L-Proline-p-
Nitroanilide

【0022】すなわち、PEP（フラボバクテリウム属由来）溶液、緩衝液、サンプルを混合した（30℃、5分間）。次いでジオキサンにとかした合成基質（Z-Gly-Pro-pNA、Z-Gly-Pro-2-NNap、及び／又はZ-Gly-Pro-MCA）を加えて、30℃で10分間反応させた。そして塩酸を加えた後、OD410nmで吸光度を測定した。

【0023】2) PEP阻害物質の調製

【0024】(a) 酒粕を原料とした場合
液化液による清酒醸造法（今安聰ら：農化，63，971（1989））により米から清酒を醸造したときの酒粕（水分36%）100gを2Lの水に懸濁し、ペプシン（1:60，000，シグマ社製）を40mg加え、37℃、pH1.5で1時間反応させ、中和したのち、沸騰水浴中で10分間加熱し、反応を停止した。5000回転10分間の遠心分離により溶解物を得て、凍結乾燥により分解物約5gを得た。

【0025】蛋白量とプロリルエンドペプチダーゼ阻害活性を測定した。阻害率は次の式により算出し、阻害率50%のときの阻害剤濃度IC50（mg/L）を下記表2に示す。

阻害率 = $(A - B) \times 100 / A$

A = 阻害剤を含まない場合の410nm吸収値

B = 阻害剤を含む場合の410nm吸収値

【0026】

【表2】

サンプル名	IC ₅₀ (mg/L)
酒粕分解物	74.0

(1) 実施例1で製造した物質

(2) ラクトース

(3) コーンスターチ

(4) ステアリン酸マグネシウム

50g

90g

29g

1g

(1)、(2)及び(3)（但し17g）を混合し、

50

(3)（但し7g）から調製したペーストとともに顆粒

* 【0027】b) プロラミンを原料とした場合

米からOsborneの溶媒分画法により分画したプロラミン画分1gを20mlの水に懸濁し、大和化成製蛋白分解酵素（サモアーゼ）20mgを加え、40℃で20時間反応させたのち、沸騰水浴中で10分間加熱し、反応を停止した。遠心分離により上清を回収した。回収した上清のIC50は113.2mg/Lであった。

【0028】

【実施例2】実施例1で得た酒粕由来の分解物粉末100g、糖類150g、蜂蜜15g、アスコルビン酸1g、クエン酸0.5g、香料適量に水を加えて1kgとし、これを95℃で20分間殺菌し、100mlずつ無菌的にビンに充填して、飲食品タイプの健康ドリンクを製造した。

【0029】

【実施例3】実施例1で得たプロラミン由来の上清200g、酢酸トコフェロール5g、硝酸チアミン10g、ニコチン酸アミド20g、無水カフェイン50g、安息香酸塩及び香料適量に脱イオン水を加えて30Lとし、殺菌した後30mlずつ無菌的にビンに充填して、医薬品としての健康ドリンクを製造した。

【0030】

【実施例4】

40

*

7

化した。得られた顆粒に (3) (但し 5 g) と (4) を加えてよく混合し、この混合物を圧縮錠剤機により圧縮して、1 錠あたり有効成分 (1) を 50 mg 含有する錠剤 1000 個を製造した。

【0031】

【発明の効果】本発明によって、すぐれた PEP 阻害用*

8

* 経口摂取物が得られる。本摂取物は、PEP 阻害能にすぐれているだけでなく、天然物由来であってきわめて安全性が高いため、長期間に亘って摂取することができ、特に痴呆症の予防、治療の目的のために、医薬品タイプ及び／又は飲食品タイプとして有利に利用することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

A 61 K 38/55

識別記号

庁内整理番号

F I

A 61 K 37/64

技術表示箇所